

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
9. Jg., S. 438—442, September 1971

## Über den Zn-Transport bei Ascites-Tumorzellen

Von Th. GÜNTHER und F. DORN

*Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin*

(Eingegangen am 11. Juni 1971)

Die  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme und  $^{65}\text{Zn}$ -Abgabe erfolgen bei Ascites-Tumorzellen unabhängig vom Zellstoffwechsel. Sulphydrylreagenzien erhöhen die Geschwindigkeit; Inkubation bei  $0^\circ$  und Änderung des physiologischen pH-Wertes senken die Geschwindigkeit des  $^{65}\text{Zn}$ -Transportes. Wahrscheinlich sind Proteine der Zellmembran am Zn-Transport beteiligt. Die Zn-Anreicherung in der Zelle führen wir auf Komplexbildung zurück.

### *Zn-transport in Ascites tumour cells*

The uptake and release of  $^{65}\text{Zn}$  by Ascites tumour cells is independent of cell metabolism. Sulphydryl reagents increase the rate of uptake and release of  $^{65}\text{Zn}$ . The rate of  $^{65}\text{Zn}$  transport is decreased by incubation at  $0^\circ$  and by changes in the physiological pH. Proteins of the cell membrane are probably involved in Zn transport. The accumulation of Zn is attributed to complex formation within the cell.

Zn ist ein lebensnotwendiges Bioelement und Bestandteil zahlreicher Enzyme. Bei seinem Mangel treten mannigfaltige Störungen auf. Zn kommt vorzugsweise intrazellulär vor. Vom Zn-Bestand eines Organs befinden sich etwa 99% in den Zellen. Zellen verschiedener Organe unterscheiden sich in ihrem Zn-Gehalt und  $^{65}\text{Zn}$ -turnover.

Leber- und Nierenzellen haben einen hohen, Muskelzellen einen niedrigen intrazellulären Zn-Gehalt. Leber- und Nierenzellen nehmen  $^{65}\text{Zn}$  mit hoher, Muskelzellen nur mit geringer Geschwindigkeit auf (1). In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, wie Zn durch die Zellmembran in Zellen und aus Zellen transportiert wird und wie die intrazelluläre Anreicherung von Zn erklärt werden kann.

### Methodik

Für die Versuche verwendeten wir Ehrlich-Mäuseascites-Tumorzellen 9 bis 12 Tage nach intraperitonealer Inokulation.

Zur Messung der  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme wurden die Zellen in einer Salzlösung, die 135 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 13,5 mM  $\text{NaHCO}_3$  und 5,5 mM Glucose enthält, mit  $0,1 \mu\text{Ci/ml}$   $^{65}\text{Zn}$  inkubiert [Radiochemical Centre Amersham, Spezifische Aktivität: 5 mCi/2,71 mg Zn]. Die Zn-Konzentration dieser Lösung war  $0,4 \mu\text{M}$ , ihr pH betrug 7,3. Die Zellkonzentration wurde, um eine gute Reproduzierbarkeit der Versuche zu erreichen, immer auf 5% [v/v] eingestellt, denn bei geringerer Zellkonzentration ergibt sich eine relativ höhere  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme. Nach Beendigung der Inkubation, die bei  $37^\circ$  unter Schütteln erfolgte, wurden die Zellen bei 4000 g abzentrifugiert und einmal in der gleichen auf  $0^\circ$  gekühlten Lösung ohne bzw. mit Zusatz von  $0,1 \text{ mM}$   $\text{ZnCl}_2$  gewaschen. Die  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität im Überstand nach dem Waschen ohne bzw. mit Zusatz von  $\text{ZnCl}_2$  war gering, so daß die extrazelluläre  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität zwischen den sedimentierten Zellen 0,2–0,5% der zellulären Aktivität betrug und zu vernachlässigen ist.

Zur Messung des Zn-Efflux wurden die Zellen in gleicher Konzentration durch 20 Min. Inkubation bei  $37^\circ$  mit  $0,5 \mu\text{Ci}$   $^{65}\text{Zn/ml}$  beladen, zweimal mit der oben beschriebenen gekühlten Salzlösung, die auf vier Teile einen Teil inaktiviertes Ascitessserum enthielt, gewaschen und in inaktiviertem Ascitessserum, das im Verhältnis 1:1 mit der Salzlösung verdünnt war, unter Zusatz von

5,5 mM Glucose inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden aliquote Teile entnommen und bei 1000 g zentrifugiert. In den Zellsedimenten wurde die  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität nach Auflösen der Zellen in 1 ml 1N NaOH unter 20 Min. Erwärmen auf  $60^\circ$  im Bohrlochkristall (Fa. Frieske und Hoepfner) gemessen.

Der Proteingehalt wurde nach Lowry und Mitarbeiter (2) bestimmt. Der Zn-Gehalt der Zellen wurde nach Veraschen in konz.  $\text{HNO}_3$ , der Zn-Gehalt des Ascitessserums nach Verdünnen im Atomabsorptionsspektrometer gemessen (1).

### Ergebnisse

Mäuseascites-Tumorzellen haben einen intrazellulären Zn-Gehalt von 1,50 mMol/kg Trockensubstanz. Der Zn-Gehalt im Ascitessserum beträgt  $17 \mu\text{Mol/l}$ .

Die Geschwindigkeit der  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme ist in Abbildung 1 dargestellt. Zn wird mit hoher Geschwindigkeit in Ascites-Tumorzellen aufgenommen. Die Geschwindigkeit der Zn-Aufnahme steigt mit der extrazellulären  $^{65}\text{Zn}$ -Konzentration (Abb. 2) linear an. Waschen mit einer auf  $0^\circ$  gekühlten, inaktives Zn enthaltenden Lösung setzt die  $^{65}\text{Zn}$ -Aktivität der Zellen nur wenig herab (Abb. 2). Eine Sättigungskinetik der  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme war im Gegensatz zu Hela-Zellen (3) bis zu einer extrazellulären Konzentration von 0,3 mM nicht festzustellen.

Das pH-Optimum der Zn-Aufnahme liegt bei pH 7,3 (Abb. 3). Mit steigender Temperatur durchläuft die Aufnahmegeschwindigkeit ein Optimum bei  $40^\circ$  (Abb. 4).

Da der Zn-Bestand eines Organs bzw. Gewebes sich zum größten Teil in den Zellen befindet (s. o.) (1) und Zn mit Proteinen, Aminosäuren usw. sehr stabile Chelate bildet, ist die Zn-Ionenaktivität in der extra- und intrazellulären Flüssigkeit wahrscheinlich sehr niedrig und nicht bekannt. Demzufolge ist eine Aussage über den Zn-Transport in bezug auf die Richtung des elektrochemischen Potentials nicht möglich, d. h. aus der Verteilung des Zn läßt sich unter Berücksichtigung des Membranpotentials nicht entscheiden, ob es einen (primären oder sekundären) aktiven Transport von Zn gibt. Da aktiver Substanztransport von energieliefernden

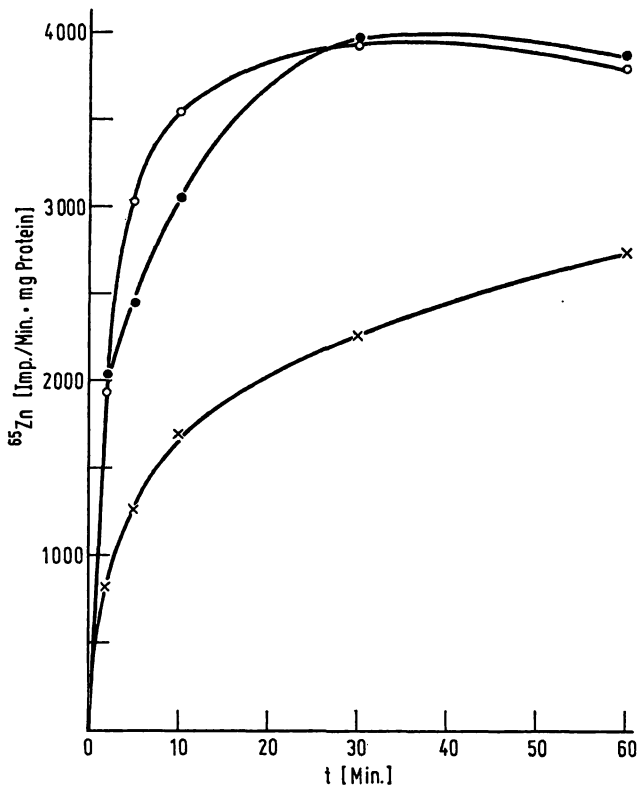


Abb. 1

<sup>65</sup>Zn-Aufnahme als Funktion der Inkubationszeit

Die Zellen wurden 10 Min. bei 37° vorinkubiert, Start durch Zugabe von <sup>65</sup>Zn. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal in gekühltem Inkubationsmedium gewaschen.  $2,9 \cdot 10^4$  Imp./Min. entsprechen 1 nMol Zn. Die extrazelluläre Zn-Konzentration betrug  $0,4 \mu\text{M}$ . ○-○ = 1 mM N-Äthylmaleinimid; ●-● = 0,1 mM HgCl<sub>2</sub>; x-x = Kontrolle

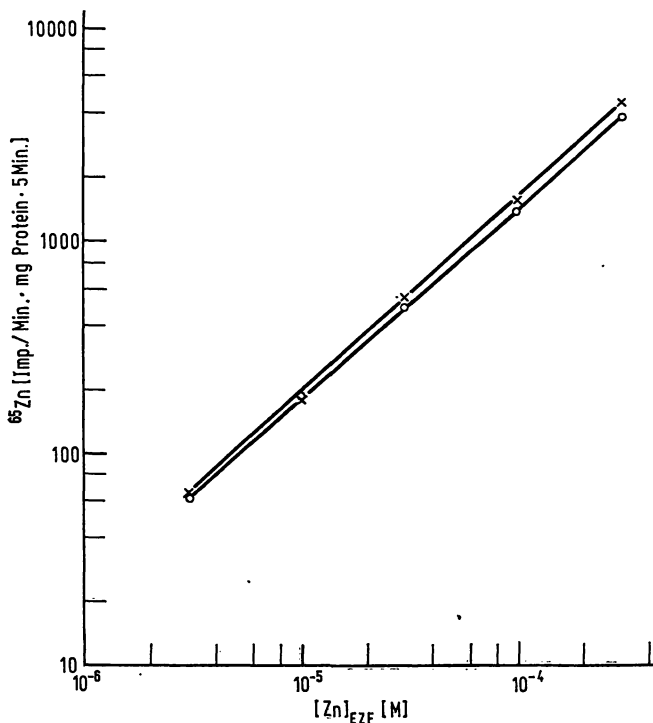


Abb. 2

Abhängigkeit der <sup>65</sup>Zn-Aufnahme von der extrazellulären Zn-Konzentration. Die Zellen wurden 10 Min. vorinkubiert, Start durch Zugabe von <sup>65</sup>Zn. Nach 5 Min. wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal in gekühltem Inkubationsmedium ohne [x-x] und mit Zn-Zusatz [○-○] gewaschen

$1,51 \cdot 10^4$  Imp./Min. entsprechen in diesen Versuchen wegen der geringer gewählten spezifischen Aktivität 100 nMol Zn

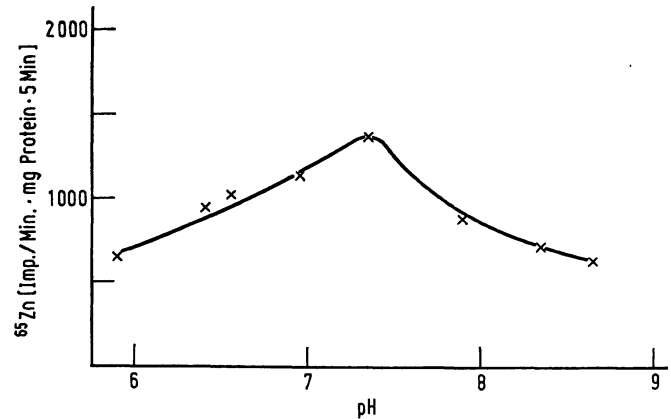


Abb. 3

Abhängigkeit der <sup>65</sup>Zn-Aufnahme vom pH

Die Zellen wurden bei 37° 10 Min. in Inkubationsmedium vorinkubiert, das 10 mM Puffer enthielt, und zwar:

unter pH 6,0 Acetatpuffer  
zwischen pH 6,5 und 7,0 Imidazol/Salzsäure  
und über pH 7,5 Tris/Salzsäure

Start durch Zugabe von <sup>65</sup>Zn. Nach 5 Min. wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal in gekühltem, gepuffertem Inkubationsmedium gewaschen

$2,9 \cdot 10^4$  Imp./Min. entsprechen 1 nMol Zn. Die extrazelluläre Zn-Konzentration betrug  $0,4 \mu\text{M}$

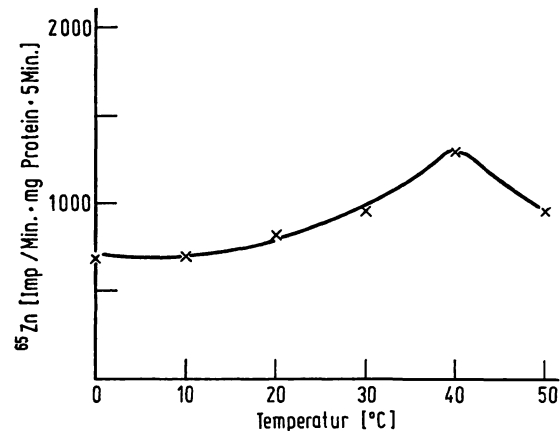


Abb. 4

Abhängigkeit der <sup>65</sup>Zn-Aufnahme von der Temperatur

Die Zellen wurden 10 Min. bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert. Start durch Zugabe von <sup>65</sup>Zn, Inkubationszeit 5 Min. Die Zellen wurden in gekühltem Inkubationsmedium einmal gewaschen.  $2,9 \cdot 10^4$  Imp./Min. entsprechen 1 nMol Zn. Die extrazelluläre Zn-Konzentration betrug  $0,4 \mu\text{M}$

Stoffwechselreaktionen abhängig ist, prüften wir den Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Zn-Aufnahme.

Tabelle 1 zeigt, daß Stoffwechselgifte wie 2,4-Dinitrophenol, Azid, Cyanid, Fluorid und Jodacetat oder Inkubation ohne Glucose keinen wesentlichen Einfluß haben. Ähnliche Ergebnisse wurden an Pflanzenzellen und Fisch-eiern gefunden (4, 5, 6). Die Zn-Aufnahme ist also nicht abhängig vom Zellstoffwechsel. Strophanthin, das die membrangebundene Na- und K-aktivierbare ATPase und den aktiven Na-K-Transport spezifisch hemmt, hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Zn-Aufnahme. Damit übereinstimmend hatte die Erniedrigung der extrazellulären Na-Konzentration (isoosmotischer Ersatz durch Cholinchlorid) und Erhöhung der extrazellulären K-Konzentration ebenfalls keine Wirkung. Daraus folgt, daß die Zn-Aufnahme nicht mit dem Na-K-Transport

Tab. 1

Einfluß verschiedener Substanzen auf die  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme in Ascites-Tumorzellen

Die Zellen wurden mit den verschiedenen Substanzen 10 Min. bei  $37^\circ$  im Wasserbad geschüttelt, danach 5 Min. mit  $^{65}\text{Zn}$  inkubiert, abzentrifugiert und einmal in gekühltem Inkubationsmedium ohne Zn-Zusatz gewaschen.  $2,9 \cdot 10^4$  Imp./Min. entsprechen 1 nMol Zn. Die extrazelluläre Zn-Konzentration betrug  $0,4 \mu\text{M}$

Substanzen	Konzentration (mM)	Imp./Min. · mg Protein · 5 Min.
Kontrolle		1330
ohne Glucose		1330
2,4-Dinitrophenol	1	1310
KCN	1	1310
NaF	10	1290
KCN + NaF	1 + 10	1290
NaN <sub>3</sub>	1	1340
Jod-Acetat	1	1380
Glykokoll	1	1320
Asparaginsäure	1	1460
Methionin	1	1470
Na-Citrat	1	1170
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	1140
Mg	1	1630
Ca	3	1680
Mn	0,1	1680
Co	0,1	1470
Ni	0,1	1340
Cu	0,1	2990
Cd	0,1	3290
Hg	0,1	3510
N-Äthylmaleinimid	1	3160
Cystein	1	680
EDTA	1	40

gekoppelt ist. Inkubation in Medien verschiedener Osmolarität, um die Membranpermeabilität infolge einer Zellschwellung zu variieren, führte zu keiner Änderung des  $^{65}\text{Zn}$ -Transportes.

Dagegen verminderten Zn-bindende Substanzen wie EDTA oder Cystein im Inkubationsmedium die Zn-Aufnahme. Substanzen, die mit Sulfhydrylgruppen reagieren, besonders  $\text{Hg}^{++}$  und N-Äthylmaleinimid, bewirken eine starke Zunahme der  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme (Tab. 1, Abb. 1) sowie eine schnellere Einstellung der steady-state-Verteilung.

Die Zn-Aufnahme kann durch andere zweiwertige Metallionen wie Ca, Mg, Mn, Co und Ni nicht gehemmt werden (Tab. 1). Eine Konkurrenz um gemeinsame Akzeptoren ist also nicht nachzuweisen. Die Beschleunigung der Zn-Aufnahme durch Cd und Cu könnte durch Reaktion dieser Ionen mit Membranbestandteilen ähnlich wie durch Hg zustande kommen.

Das aufgenommene  $^{65}\text{Zn}$  kann teilweise wieder aus den Zellen abgegeben werden, wahrscheinlich im Austausch gegen Zn des Inkubationsmediums, denn bei einer extrazellulären Zn-Konzentration von  $0,3 \text{ mM}$  gelangt wesentlich mehr Zn nach außen als bei den Kontrollansätzen in verdünntem Ascitessserum mit  $9 \mu\text{M}$  Zn. Der  $^{65}\text{Zn}$ -Efflux ist analog zum  $^{65}\text{Zn}$ -Influx durch Stoffwechselinhibitoren nicht signifikant zu beeinflussen. Dagegen erhöhen Hg und N-Äthylmaleinimid auch den  $^{65}\text{Zn}$ -Efflux (Abb. 5). Der intrazelluläre  $^{65}\text{Zn}$ -Gehalt (Abb. 5 und 6), dessen

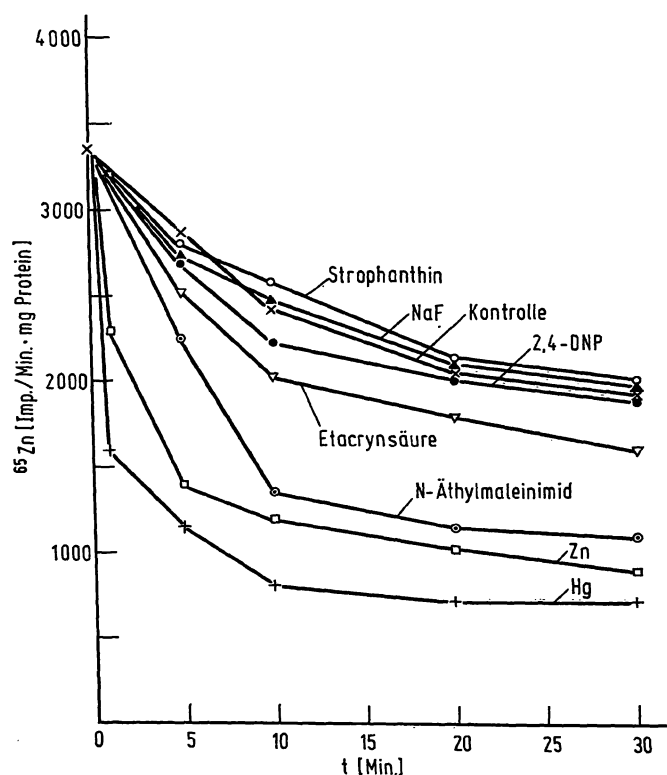


Abb. 5

Einfluß verschiedener Inhibitoren auf den  $^{65}\text{Zn}$ -Efflux

Die Zellen wurden 20 Min. bei  $37^\circ$  im Inkubationsmedium mit  $^{65}\text{Zn}$  vorbeladen, dann in Inkubationsmedium-Ascitessserum [4:1] zweimal gewaschen und in Inkubationsmedium-Ascitessserum [1:1] mit den Inhibitoren reinkubiert

Inhibitor	Konzentration [mM]
Zn = $[\text{ZnCl}_2]$	0,3
Strophanthin	1
NaF	10
2,4-Dinitrophenol	1
Etacrynsäure	1
N-Äthylmaleinimid	1
HgCl <sub>2</sub>	0,3

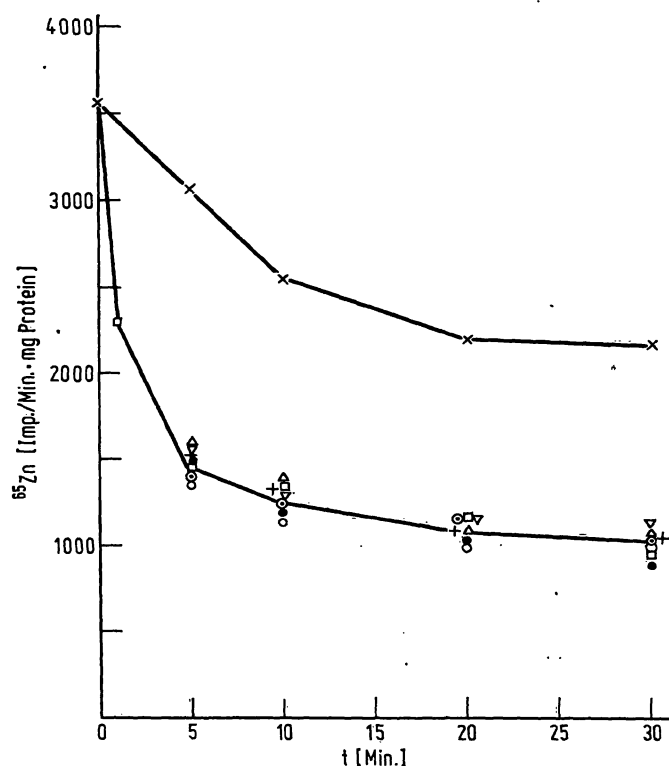


Abb. 6

Einfluß verschiedener Inhibitoren auf den  $^{65}\text{Zn}$ -Efflux bei einer extrazellulären  $\text{ZnCl}_2$ -Konzentration von  $0,3 \text{ mM}$  siehe Legende Abbildung 5

x = Kontrolle ohne $\text{ZnCl}_2$	+ = KCN + NaF
∇ = Etacrynsäure	o = Strophanthin
△ = NaF	□ = Kontrolle mit $0,3 \text{ mM}$ $\text{ZnCl}_2$
○ = KCN 1 mM	• = 2,4-Dinitrophenol

Abnahme den Zn-Efflux darstellt, kann nicht wie in den übrigen Abbildungen und in der Tabelle in nMol Zn umgerechnet werden, denn die spezifische Aktivität des intrazellulären  $^{65}\text{Zn}$  kann nicht angegeben werden, weil wir zur Vermeidung einer Zellschädigung infolge zu langer Versuchsdauer die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts des  $^{65}\text{Zn}$  nicht abgewartet haben und das intrazelluläre  $^{65}\text{Zn}$  in der Zelle wahrscheinlich nicht gleichmäßig verteilt ist.

Als weiteren Test, ob am Zn-Efflux stoffwechselabhängige Reaktionen beteiligt sind, prüften wir den Einfluß von Inhibitoren auf den bei hohen extrazellulären Zn-Konzentrationen verstärkten  $^{65}\text{Zn}$ -Efflux (Abb. 6). Dabei ergab sich, daß die Stoffwechselinhibitoren auch den erhöhten Zn-Efflux nicht veränderten. Dagegen bewirkte die Inkubation bei  $0^\circ$  eine starke Abnahme des  $^{65}\text{Zn}$ -Effluxes sowohl bei einer extrazellulären Zn-Konzentration von  $9\ \mu\text{M}$  wie auch bei  $0,3\ \text{mM}$  Zn (Abb. 7).

Außerdem untersuchten wir die Wirkung einer gehemmten Proteinbiosynthese und fanden, daß intraperitoneale Injektion von  $0,5\ \text{mg}$  Cycloheximid pro Maus 18 Stunden vor der Zellentnahme keinen signifikanten Effekt auf  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme und  $^{65}\text{Zn}$ -Abgabe der vorbehandelten Zellen hatte.

## Diskussion

Die  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme kann nur zu einem geringen Teil auf  $^{65}\text{Zn}$ -Bindung an die Zellmembran beruhen, denn beim Waschen mit gekühlter, inaktives Zn enthaltender Lö-

sung wird von den mit Inhibitoren behandelten und den unbehandelten Zellen nur wenig  $^{65}\text{Zn}$  entfernt. Das von den Zellen aufgenommene Zn muß also zum überwiegenden Teil in einer bei  $0^\circ$  nur geringfügig austauschbaren Fraktion vorliegen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um intrazelluläres Zn. Wie die Inkubation bei  $0^\circ$  zeigt (Abb. 7), wird hierbei der bei  $37^\circ$  schnelle Zn-Efflux stark reduziert. Beim Waschen der Zellen mit auf  $0^\circ$  gekühlten Zn-freien und Zn-haltigen Lösungen wird also hauptsächlich das extrazelluläre und nur wenig intrazelluläres  $^{65}\text{Zn}$  entfernt. Das erklärt, weshalb beim Waschen mit Zn-haltiger Lösung gegenüber Zn-freier Lösung nur wenig  $^{65}\text{Zn}$  von den Zellen entfernt wird.

Die mit steigender extrazellulärer Zn-Konzentration linear zunehmende  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahmegeschwindigkeit, die auch bei Pflanzenzellen gefunden wurde (5), eine fehlende Hemmung durch andere zweiwertige Kationen und der fehlende Einfluß von Stoffwechselinhibitoren lassen den Schluß zu, daß bei der Zn-Aufnahme in Ascites-Tumorzellen kein stoffwechselabhängiger aktiver Transport vorliegt. Der Zn-Transport könnte demnach durch Diffusion bzw. Austauschdiffusion erfolgen.

Der Zn-Transport scheint teilweise reversibel zu sein, denn die  $^{65}\text{Zn}$ -Abgabe aus vorbeladenen Ascites-Tumorzellen verhält sich unter Einwirkung von Stoffwechselinhibitoren und Sulfhydrylreagenzien analog wie die  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme. In der Kälte ist die Zn-Abgabe jedoch stärker herabgesetzt als die Zn-Aufnahme. Das mag z. T. daran liegen, daß bei der Messung der  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme nicht exakt zwischen  $^{65}\text{Zn}$ -Bindung an die Zellmembran und intrazellulärer  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme zu differenzieren ist.

Die Zn-Aufnahme in Hela-Zellen zeigte eine Sättigungskinetik. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit wurde bei einer extrazellulären Zn-Konzentration von etwa  $0,1\ \text{mM}$  erreicht (3). Man kann daraus auf die Existenz eines geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes in der Membran dieser Zellen schließen.

Der Zn-Transport in und aus Ascites-Tumorzellen erfolgt nicht mit seiner maximalen Geschwindigkeit, denn er wird durch Sulfhydrylgruppenblocker wie  $\text{Hg}^{2+}$  und N-Äthylmaleinimid stark erhöht. Offenbar können Membranproteine, die mit SH-Reagenzien reagieren, den Transport von Zn durch die Membran von Ascites-Tumorzellen verzögern. Wahrscheinlich sind diese Proteine, wie man aus der Wirkung der schlecht permeierenden Schwermetallionen folgern kann, auf der Zellmembran und nicht im Zellinnern lokalisiert. Da sich der Zn-Transport mit dem extrazellulären pH und der Temperatur ändert und vom Stoffwechsel unabhängig ist, kann man den Schluß ziehen, daß der Zn-Transport vom Ladungszustand funktioneller Gruppen und von der Konformation von Proteinen bzw. Lipoproteinen der Zellmembran beeinflusst wird. Vielleicht besteht hierin eine Möglichkeit zur Regulation, denn die Geschwindigkeit des Zn-Transportes in verschiedene Zellen weist erhebliche Unterschiede auf.

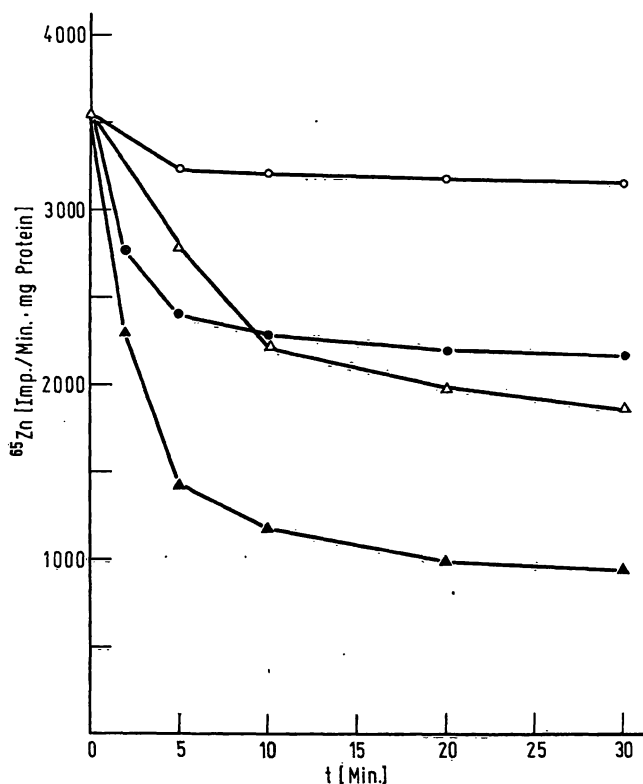


Abb. 7

$^{65}\text{Zn}$ -Efflux bei  $37^\circ$  [ $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ] und  $0^\circ$  [ $\circ$ ,  $\bullet$ ] sowie bei einer extrazellulären Zn-Konzentration von  $9\ \mu\text{M}$  [ $\Delta$ ,  $\circ$ ] bzw.  $0,3\ \text{mM}$  [ $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ]

Mit ihrem hohen Zn-Gehalt und ihrem schnellen  $^{65}\text{Zn}$ -turnover verhalten sich Ascites-Tumorzellen wie Leber- und Nierenzellen. Die Ergebnisse an Ascites-Tumorzellen lassen sich daher wahrscheinlich auf diese Zellen übertragen. Muskel- oder Hela-Zellen verhalten sich dagegen anders. Diese Zellen nehmen  $^{65}\text{Zn}$  mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit auf. Nach Adrenalektomie ist die  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme in Muskelzellen im Gegensatz zu Leber und Niere (1) verlangsamt. Glucocorticoide erhöhen im Gegensatz zu Leber und Niere den Zn-Gehalt von Muskelzellen (1) und die  $^{65}\text{Zn}$ -Aufnahme in Hela-Zellen (3). Ob die Unterschiede zwischen verschiedenen

Zellarten unter Voraussetzung eines einheitlichen Transportmechanismus durch verschiedene Eigenschaften eines Carriers oder anderer am Transport beteiligter Proteine zu erklären sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

Da wir keinen stoffwechselabhängigen aktiven Transportmechanismus für Zn fanden, Zn aber intrazellulär stark angereichert ist und Zn andererseits mit intrazellulären Liganden stabile Chelate bildet, kann die Zn-Anreicherung in der Zelle durch Komplexbildung erklärt werden.

### Literatur

1. DORN, F. und TH. GÜNTHER, diese Z. 8, 618 (1970). — 2. LOWRY, O. H., N. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951). — 3. COX, R. P., Mol. Pharmacol. 4, 510 (1968). — 4. BRODA, E., H. DESSER und G. FINDENEGG, Naturwissenschaften 41, 361 (1964). — 5. RATHORE, V. S., S. H. WITTWER, W. H. JYUNG, V. P. S. BAJAJ und M. W. ADAMS, Physiol. Plant. 23, 908 (1970). — 6. WEDEMEYER, G., Comp. Biochem. Physiol. 26, 271 (1968).

Prof. Dr. Th. Günther  
1000 Berlin 33  
Arnimallee 22